

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学号: 22420081151487

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

拟穴青蟹与中国鲎雌激素相关受体基因的  
克隆与表达研究

Cloning and expression of estrogen related receptor gene  
from *Scylla paramamosain* and *Tachypleus tridentatus*

黄静茹

指导教师姓名: 黄辉洋 副教授

专 业 名 称: 海 洋 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 09 月

论文答辩时间: 2011 年 09 月

2011 年 09 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目录

缩略词中英文对照表.....	1
摘要 .....	4
Abstract.....	6
第一章 前言 .....	8
1.1 核受体研究概况.....	8
1.1.1 核受体的发现及分类 .....	8
1.1.2 核受体的结构与功能 .....	9
1.2 雌激素相关受体的研究进展.....	10
1.2.1 ERRs 的发现和概述.....	10
1.2.2 ERRs 的表达分布.....	12
1.2.3 ERRs 的作用机制.....	13
1.2.4 ERRs 的生物学功能和靶基因 .....	14
1.2.5 ERRs、ERs 和 E2 的交互关系 .....	17
1.2.6 非哺乳动物 ERRs 研究概况 .....	17
1.3 研究目的和意义.....	19
第二章 拟穴青蟹和中国鲎雌激素相关受体基因 cDNA 和 gDNA 序列的克隆 .....	21
2.1 实验材料.....	21
2.1.1 实验动物.....	21
2.1.2 主要仪器设备 .....	21
2.1.3 实验试剂.....	21
2.1.4 主要溶液配制.....	22
2.2 实验方法.....	22
2.2.1 引物设计.....	22

2.2.2 总 RNA、DNA 提取及 cDNA 制备 .....	23
2.2.3 拟穴青蟹 spERR 基因 cDNA 和 gDNA 序列扩增 .....	25
2.2.4 中国鲎 ttERR 基因 cDNA 和 gDNA 序列扩增 .....	36
2.2.5 拟穴青蟹 spERR 和中国鲎 ttERR 序列分析 .....	42
2.3 结果与讨论 .....	42
2.3.1 总 RNA 和 DNA 的提取 .....	42
2.3.2 拟穴青蟹 spERR 和中国鲎 ttERR 基因 cDNA 的序列特征 .....	43
2.3.3 拟穴青蟹 spERR 和中国鲎 ttERR 基因鉴定 .....	47
2.3.4 拟穴青蟹 spERR 和中国鲎 ttERR 基因结构分析 .....	49
2.3.5 蛋白质序列分析 .....	51
2.4 小结 .....	61
<b>第三章 拟穴青蟹雌激素相关受体的相对实时定量表达 .....</b>	<b>63</b>
3.1 实验材料 .....	63
3.1.1 实验动物 .....	63
3.1.2 主要仪器设备 .....	63
3.1.3 主要试剂 .....	63
3.2 实验方法 .....	63
3.2.1 拟穴青蟹卵巢发育各阶段的组织学观察 .....	63
3.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的制备 .....	64
3.2.3 内参选择与引物设计 .....	64
3.2.4 实时定量 PCR .....	65
3.2.5 数据分析 .....	67
3.3 实验结果 .....	67
3.3.1 拟穴青蟹卵巢发育阶段的划分 .....	67
3.3.2 实时定量 PCR 条件确定 .....	68
3.3.3 spERR 在拟穴青蟹卵巢各发育阶段的表达分析 .....	69
3.3.4 拟穴青蟹 ERR 在成体组织中的分布模式 .....	71
3.4 讨论 .....	74

第四章 总结与展望 .....	76
4.1 总结 .....	76
4.2 创新点 .....	77
4.3 展望 .....	77
参考文献 .....	78
在学期间参与的科研项目及成果 .....	89
致谢 .....	90

## Contents

Lists of abbreviation .....	1
Abstract in Chinese .....	4
Abstract in English .....	6
Chapter 1 Introduction .....	8
1.1 Research summary of nuclear receptor .....	8
1.1.1 The discovery and classification of nuclear receptor .....	8
1.1.2 The structure and function of nuclear receptor .....	9
1.2 The research progress of estrogen related receptors .....	10
1.2.1 The discovery and summary of ERRs .....	10
1.2.2 The expression distribution of ERRs .....	12
1.2.3 The action mechanism of ERRs .....	13
1.2.4 The biological function and target genes of ERRs .....	14
1.2.5 The interaction among ERRs, ERs and E2 .....	17
1.2.6 Review on the study of non-mammalian ERRs .....	17
1.3 The objective and significance of this study .....	19
Chapter 2 Cloning of cDNA and gDNA of estrogen related receptor gene from <i>Scylla paramamosain</i> and <i>Tachypleus tridentatus</i> .....	21
2.1 Material .....	21
2.1.1 Animals .....	21
2.1.2 Main equipments .....	21
2.1.3 Reagent .....	21
2.1.4 The preparation of main solution .....	22
2.2 Methods .....	22
2.2.1 Primers design .....	22

2.2.2 The extraction and preparation of total RNA, DNA and cDNA .....	23
2.2.3 The amplification of spERR cDNA and gDNA from <i>S. paramamosain</i> .....	25
2.2.4 The amplification of ttERR cDNA and gDNA from <i>T. tridentatus</i> .....	36
2.2.5 Sequence analysis of spERR and ttERR .....	42
2.3 Results and discussion .....	42
2.3.1 The extraction of total RNA and DNA .....	42
2.3.2 The sequence characteristic of spERR and ttERR cDNA .....	43
2.3.3 The identification of spERR and ttERR gene .....	47
2.3.4 The gene structure analysis of spERR and ttERR .....	49
2.3.5 The analysis of protein sequence .....	51
2.4 Conclusion .....	61
Chapter 3 Real-time quantitative PCR analysis of spERR from <i>S.</i>	
<i>paramamosain</i> .....	63
3.1 Material .....	63
3.1.1 Animals .....	63
3.1.2 Main equipments .....	63
3.1.3 Main reagent .....	63
3.2 Methods .....	63
3.2.1 The histological observation of ovary at different development stages of <i>S. paramamosain</i> .....	63
3.2.2 The extraction and preparation of total RNA and cDNA .....	64
3.2.3 The selection of internal control gene and primers design .....	64
3.2.4 The real-time quantitative PCR .....	65
3.2.5 Data analysis .....	67
3.3 Results .....	67
3.3.1 The development stages of ovary in <i>S. paramamosain</i> .....	67
3.3.2 The optimizing reaction condition of real-time quantitative PCR .....	68
3.3.3 The expression analysis of spERR at different ovarian development stages	



of <i>S.paramamosain</i> .....	69
3.3.4 The distribution pattern of spERR in adult tissues of <i>S.paramamosain</i> .....	71
3.4 Discussion .....	74
Chapter 4 Conclusion and prospective.....	76
4.1 Conclusion .....	76
4.2 Innovation .....	77
4.3 Prospective.....	77
References.....	78
Research projects and achievements .....	89
Acknowledgements.....	90

## 缩略词中英文对照表

缩略词	英文全称	中文全称
4-OHT	4-hydroxytam oxifen	4-羟他莫昔芬
Aco2	aconitase 2	顺乌头酸酶 2
AF	activation function	转录激活域
ANT1	adenine nucleotide translocator 1	腺苷酸转运体 1
ApoA4	apolipoprotein A4	载脂蛋白 A4
AR	androgens receptor	雄激素受体
ATPsynb	ATP synthase b	ATP 合成酶 b
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	基本局域联配搜寻工具
Casq2	cardiac calsequestrin	心脏隐钙素
cDNA	complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
Ckmts	creatine kinase muscle type	肌肉肌酸激酶
COX4	cyclooxygenase 4	环氧化酶 4
CPT1A	carnitine palmytoyltransferase 1A	肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A
Cycs	cytochrome c	细胞色素 c
DBD	DNA binding domain	DNA 结合域
DDW	double distilled water	双蒸水
DES	diethylstilbestrol	乙烯雌酚
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTPs	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
EcR	ecdysone receptor	蜕皮激素受体
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	内皮性一氧化氮合成酶
ER	estrogen receptor	雌激素受体
ERE	ER responsive element	ER 反应元件
ERR	estrogen-related receptor	雌激素相关受体
ERRE	ERR responsive element	ERR 反应元件
Gabpa	GA binding protein transcription factor alpha	GA 结合蛋白转录因子 $\alpha$

## 缩略词中英文对照表（续）

缩略词	英文全称	中文全称
gDNA	genomic DNA	基因组 DNA
GR	glucocorticoid receptor	糖皮质激素受体
GRIP1	glucocorticoid receptor interacting protein 1	糖皮质激素受体相互作用蛋白 1
HRE	hormone response elements	激素反应元件
IDH3A	isocitrate dehydrogenase $\alpha$	异柠檬酸脱氢酶 $\alpha$
KCNQ1	K <sup>+</sup> channel	电压门控钾通道蛋白
LB	Luria-Bertani medium	大肠杆菌培养基
LBD	ligand binding domain	配体结合域
Ldb3	LIM-domain-binding protein	LIM 域结合蛋白
MAO-B	monoamine oxidase B	单胺氧化酶 B
MCAD 或 Acadm	medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase	中链酰基辅酶 A 脱氢酶
MHRE	multiple steroid hormone response element half sites	多种类固醇激素反应元件半位点
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国立生物信息中心
N-J	neighbor-joining	邻位相接法
NLS	nuclear localization signal	核定位信号
NR	nuclear receptor	核受体
OPN	osteopontin	骨桥蛋白
ORF	open reading frame	开放阅读框
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase 4	丙酮酸脱氢酶激酶 4
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase	磷酸烯醇丙酮酸盐羧基酶
PGC	peroxisome proliferator-activated receptor coactivator	过氧化物酶体增殖物激活受体共激活子

缩略词中英文对照表（续）

缩略词	英文全称	中文全称
pI	Isoelectric point	等电点
PIK2	Polo-like kinase 2	Polo 样激酶 2
PPAR $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor	过氧化物酶体增植物激活受体
PR	progesterone receptor	孕激素受体
RACE	rapid amplification of cDNA ends	快速扩增 cDNA 末端
rpm	revolutions per minute	每分钟转数
RT	reverse transcription	反转录
RXR	retinoid X receptor	维甲类 X 受体
SF-1	steroid factor-1	类固醇生成因子-1
SFRE	steroid factor-1 responsive element	SF-1 反应元件
SHP	small heterodimer partner	小异二聚体伴侣
SP-A	surfactant protein A	表面活性剂蛋白 A
SRC	steroid receptor coactivator	类固醇受体共激活子
TAM	tamoxifen	他莫昔芬
TFF1 或 pS2	trefoil factor 1	三叶因子 1
Tm	melting temperature	退火温度
TR	thyroid hormone receptor	甲状腺激素受体
UCP-1	uncoupling protein 1	解偶联蛋白 1
UTR	untranslated region	非翻译区

## 摘要

雌激素相关受体 (estrogen-related receptors, ERRs) 属于孤儿核受体, 在结构上和雌激素受体 (estrogen receptors, ERs) 非常类似, 能够直接与类固醇受体共激活子结合激活靶基因的表达。对哺乳动物的研究表明, ERRs 参与雌激素信号通路, 与生殖和发育过程有关。

本文采用 RT-PCR、RACE、Genome Walking 等方法从拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 和中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 中克隆得到雌激素相关受体基因, 分别命名为 spERR 和 ttERR, 并采用生物信息学方法对其序列和编码的蛋白质的理化性质、分子系统进化关系等进行了预测和推断; 通过实时定量 PCR 对拟穴青蟹成体组织器官和卵巢发育各阶段中 ERR 基因的 mRNA 表达水平进行了相对定量研究, 结果总结如下:

1) 拟穴青蟹雌激素相关受体基因 spERR 的 cDNA 全长 2412 bp, 5'-UTR 为 275 bp, 3'-UTR 为 634 bp, 开放阅读框为 1503 bp, 编码一个由 500 个氨基酸组成的蛋白质。spERR 基因由 9 个内含子和 10 个外显子组成。

2) 中国鲎雌激素相关受体基因 ttERR 的 cDNA 全长 2722 bp, 包含一个 1413 bp 的开放阅读框、626 bp 的 5'-UTR 和 683 bp 的 3'-UTR, 编码一个由 470 个氨基酸组成的蛋白质。ttERR 基因由 10 个内含子和 11 个外显子组成。

3) 序列分析发现 spERR 和 ttERR 的外显子 GC 含量均大于内含子的 GC 含量, 表明基因组中编码区比非编码区具有更高的热稳定性。同源性分析表明, spERR 和 ttERR 均包含核受体超家族保守的两个功能结构域——DNA 结合结构域和配体结合结构域, 且与其他动物的 ERRs 同源性很高, 推断 spERR 和 ttERR 属于核受体超家族第 3 亚族。系统发育分析结果也支持该结论。

4) 采用实时定量 PCR 方法分析 spERR 在拟穴青蟹中的时空表达特征, 结果显示 spERR 广泛分布于各成体组织器官中, 表达模式与底鳉 (*Fundulus heteroclitus*) ERR $\alpha$  的分布相似, 而且在雌、雄蟹中各自高表达于不同组织, 提示 spERR 在雌、雄蟹中执行不同功能。spERR 在拟穴青蟹卵巢发育早期表达量显著增加, 之后随着卵巢发育又逐渐减少, 提示其与卵原细胞的增殖和卵母细胞的分化发育密切相关。

本研究首次克隆获得甲壳纲拟穴青蟹和肢口纲中国鲎 ERR 基因 cDNA 全长

和 gDNA 序列，并进行生物信息学分析；探讨了 spERR 在拟穴青蟹中的时空表达特征。这些研究有助于深入探讨节肢动物 ERRs 的具体功能，为 ERRs 的系统演化分析奠定理论基础。

**关键词：**拟穴青蟹；中国鲎；雌激素相关受体；分子克隆；生物信息学分析；实时定量 PCR

## Abstract

The estrogen related receptors ERRs, belonging to orphan nuclear receptors, share the similar structure with the estrogen receptors ERs. ERRs can bind to the steroid receptor coactivator family without any ligands and drive transcription activity of the target genes. The results have suggested mammalian ERRs collaborate with the estrogen signaling, involving in reproductive and developmental processes.

In this paper, we have isolated the ERRs homolog from *Scylla paramamosain* and *Tachypleus tridentatus* using RT-PCR, RACE and Genomic Walking methods. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence were analyzed and characterized by bioinformatics methods. Real-time quantitative PCR was performed for the tissue distribution and differential expression of spERR mRNA during ovarian development of *S.paramamosain*. The main results are offered as follows:

1) The full-length cDNA of spERR gene is 2412 bp, containing a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 275 bp and a 3'-UTR of 634 bp. The open reading frame of 1503 bp encodes a 500-amino acid protein. The ttERR gene is composed of nine introns and ten exons.

2) The results showed that the full-length cDNA of ttERR gene is 2722 bp, containing a 5'-UTR of 626 bp and a 3'-UTR of 683 bp. The open reading frame of 1413 bp encodes a 470-amino acid protein. The ttERR gene is composed of ten introns and eleven exons.

3) The GC content of exons was greater than that of introns in spERR and ttERR, reflecting a greater thermal stability of the coding regions than that of the noncoding regions. The homologous analysis suggest that the spERR and ttERR protein contain two conserved regions of nuclear receptor superfamily—DNA binding domain and ligand binding domain, and share high identity with other ERRs. Phylogram also indicated that the spERR and ttERR belong to nuclear receptors subfamily 3.

4) Real-time quantitative PCR was performed to quantify the spatio-temporal expression of spERR transcripts. The results displayed that spERR was broadly

expressed in adult tissues and organs. The expression pattern of spERR is consistent with the ERR $\alpha$  of *Fundulus heteroclitus*. Males and females showed some differences in spERR expression, suggesting different functions of spERR in males and females. The expression of spERR was observed to increase significantly from undeveloped stage to early developing stage, then gradually decrease during the development of ovary. These suggested that spERR plays critical roles in proliferation of oogoniums, differentiation and early development of oocytes.

For the first time, we have cloned the full-length cDNAs and gDNA of ERR genes from the Crustacean, *S. paramamosain* and the Merostomata, *T. tridentatus*, and the genes were analyzed and characterized by bioinformatics methods. We also studied on the spatio-temporal expression of spERR transcripts in *S. paramamosain*. This study may facilitate to understand the important functions of ERRs in arthropod and establish theories foundation for analysing the phylogeny of ERRs.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; *Tachypleus tridentatus*; estrogen-related receptor; molecular cloning; bioinformatic analysis; real-time quantitative PCR



## 第一章 前言

### 1.1 核受体研究概况

#### 1.1.1 核受体的发现及分类

核受体 (nuclear receptor, NR) 是多细胞生物中含量非常丰富的几大类转录因子超家族之一, 由经典的类固醇激素受体、非类固醇激素受体以及孤儿受体组成, 种类繁多, 功能多样, 涉及到调节动态平衡、生殖、发育和新陈代谢等多个方面<sup>[1]</sup>。对核受体的研究始于人们对类固醇激素组织特异性的结合并能引起相应生理化学变化这一现象的观察。但直到 1969 年, 由于合成了同位素标记的配体, 才第一次在靶组织中证实存在与雌激素特异结合的蛋白质, 即雌激素受体<sup>[2]</sup>, 从而揭开了类固醇激素受体研究的新篇章。1974 年, Ashburner 等<sup>[3]</sup>观察到蜕皮激素能触发线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 多线染色体的蓬松化 (基因转录的染色体标志), 因此人们推测可能是此类脂溶性激素通过细胞膜后能与胞内特定受体结合并进入核内影响靶基因的转录。1977 年, Schrader 等<sup>[4]</sup>利用放射性标记配体技术分离并纯化了孕激素受体 (progesterone receptor, PR), 随后越来越多的核受体相继被分离出来。通过对这些纯化后的核受体的进一步研究, 受体活化的一般机制得到了一定的了解和认识。Yamamoto<sup>[5]</sup>提出类固醇激素作用的经典模型: 类固醇激素与受体结合后, 引起受体构象改变, 使激素-受体复合物能够与染色质中的特异结合位点呈高亲和力特异结合, 调节基因的表达, 并最终引起各种相应的生物学效应。

类固醇受体的克隆成为深入理解经典模式的必要前提。1985 年, 第一个核受体——糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 被克隆成功<sup>[6]</sup>, 随后, 雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、PR、雄激素受体 (androgens receptor, AR)、甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor, TR) cDNA 也得以克隆<sup>[7]</sup>。这些受体的成功克隆标志着对核受体研究的突破, 并证明化学结构完全不同的激素是通过在结构上密切相关的同一类受体的介导而发挥作用的。基于核受体成员间具有很高的同源性, Evans<sup>[7]</sup>提出核受体超家族的全新概念。1990 年发现的维甲类 X 受体 (retinoid X receptor, RXR)<sup>[8]</sup>也是核受体研究领域中的重要突破之一: 一方面, RXR 是第一个找到配体的孤儿受体 (其配体为 9-顺式维甲酸)<sup>[9]</sup>; 另一方面, RXR 又可以和其他多种核受体成员形成异二聚体, 共同参与信号转导,

使人们对该类激素的信号转导系统有了全新的认识。1991 年在昆虫中首次克隆出蜕皮激素受体 (ecdysone receptor, EcR)<sup>[10]</sup>, 并证明该受体同属于核受体超家族成员, 提示核受体在整个动物界存在的普遍性及在进化上的保守性。目前的研究发现, 果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 基因组包含 21 个核受体基因<sup>[11]</sup>; 人类基因组包含 48 个核受体基因<sup>[12]</sup>; 小鼠基因组包含 49 个 (比人类多一个法尼酯 X 受体)<sup>[13]</sup>; 而在线虫基因组中存在多于 270 个核受体基因<sup>[14]</sup>。

1999 年, 核受体命名委员会 (Nuclear Receptor Nomenclature Committee) 规定了核受体的统一命名格式<sup>[15]</sup>, 即 NRxyz, x 代表 subfamily, y 代表 group, z 代表基因。该体系依据同源性将核受体分为 6 个亚家族(subfamily), 以 1、2、……、6 表示, 对只含有一个保守区域 (即 DNA 结合域或配体结合域) 的非典型核受体, 不管其在进化上的相关程度如何, 一律独立命名为 0 亚家族; 每一亚家族又分为若干组 (group), 以 A、B、……表示, 同组的各成员之间的 DNA 结合域 (DNA binding domain, DBD) 同源性应在 80-90%, 而配体结合域 (ligand binding domain, LBD) 同源性也应达到 40-60%; 最后同组中的不同核受体再以 1、2、……进行区分。

### 1.1.2 核受体的结构与功能

在结构上, 核受体由位于 N 端的 A/B 区域、DNA 结合域 C、铰链区 D、配体结合域 E 和 C 端的 F 区组成 (图 1-1)<sup>[16]</sup>:

A/B 区域序列高度可变, 长度不一, 由少于 50 至 500 多个氨基酸组成, 包含至少一种本身有活性的配体非依赖性的转录激活域 1 (activation function 1, AF-1)。

C 区为 DNA 结合域, 是核受体最保守的区域, 负责识别和结合靶基因中的激素反应元件 (hormone response elements, HRE), 通常包含两个高度保守的锌指结构<sup>[17]</sup>: C-X2-C-X13-C-X2-C (锌指 I) 和 C-X5-C-X9-C-X2-C (锌指 II)。每个锌指结构由 4 个半胱氨酸 C 和中心部位的一个锌离子螯合而成。

D 铰链区, 较短且不保守, 主要是在 C 区和 E 区之间其铰链作用, 该区含有核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)。

E 区为配体结合域, 是一个由 11-12 个  $\alpha$  螺旋 (H1-H12) 形成的三明治式的结构, 保守性仅次于 DBD, 配体依赖的转录激活由 H12 中的 AF-2 介导。LBD

是一个复杂的结构域，主要介导配体结合、辅因子招募和二聚体形成。

有些核受体还包含一个 F 区，在 E 区的 C 端外，序列高度可变，其结构和功能尚不十分清楚，可能参与配体的精确识别<sup>[18]</sup>和核受体辅抑因子的招募<sup>[19, 20]</sup>。

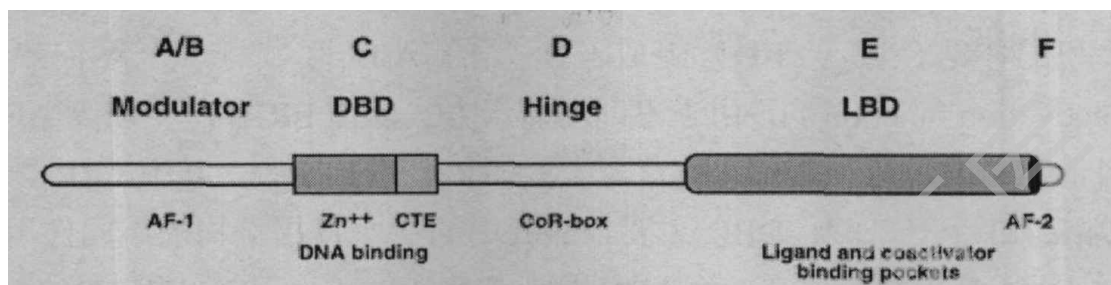


图 1-1 核受体的结构<sup>[21]</sup>

Fig. 1-1 The structure of nuclear receptor<sup>[21]</sup>

## 1.2 雌激素相关受体的研究进展

### 1.2.1 ERRs 的发现和概述

1988 年，Giguère 等<sup>[22]</sup>利用 ER $\alpha$  的 DNA 结合域保守序列作为探针，采用低严谨度杂交法从人类肾 cDNA 文库筛选得到最早的孤儿核受体——ERR $\alpha$  和 ERR $\beta$ 。Eudy 等<sup>[23]</sup>于 1998 年以糖皮质激素相互作用蛋白 1 (glucocorticoid receptor interacting protein 1, GRIP1) 为诱饵通过酵母菌双杂交技术筛选得到第三种亚型 ERR $\gamma$ 。核受体命名委员会分别将它们命名为 NR3B1、NR3B2、NR3B3。ERRs 与经典的 ERs 在 DBD 和 LBD 具有很高的相似性，分别约为 70% 和 35% (图 1-2)，这是它们与 DNA 结合的一致性及激素结合的差异性的分子结构基础，这两个特点对 ERRs 和 ERs 的功能关系有重要影响。

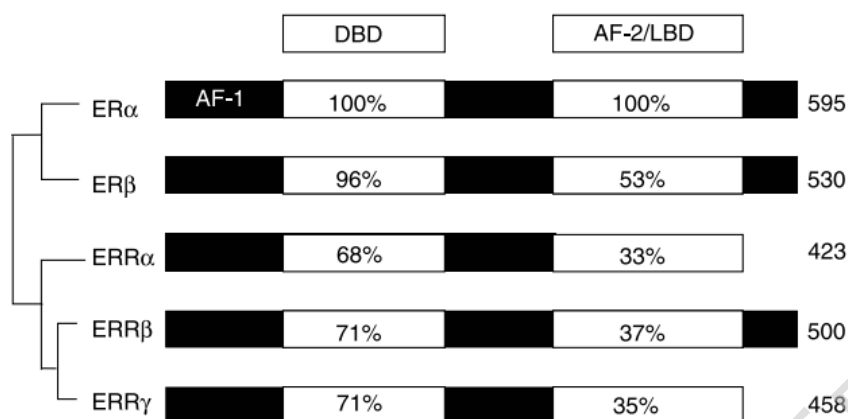


图 1-2 ERs 和 ERRs 在 DBD 和 LBD 的氨基酸序列相似性<sup>[24]</sup>

Fig. 1-2 Amino acid identity between the ERs and ERRs in the DBD and LBD<sup>[24]</sup>

三种 ERR 亚型在结构上具有高度同源性，但分别由不同基因编码组成。染色体作图显示，人 ERRα 基因定位于染色体 11q13，全长约 20 kb，由 7 个外显子和 6 个内含子组成，高度保守的 DBD 位于外显子 2 和 3 内，该基因缺乏典型的 TATA 和 CAAT 盒，有 10 个 SP1 结合元件和两个 E 盒以及多个 CpG 岛，含有两个转录起始位点，主要起始点 (+1) 和次要起始点 (-59)，分别编码 422 和 506 个氨基酸组成的多肽；ERRβ 定位于染色体 14q24.3，全长 139 kb，在体内有多种表达方式，常见的转录产物长 5.5 kb，编码一条由 500 个氨基酸组成的多肽<sup>[25]</sup>；ERRγ 基因定位于染色体 1q32，全长 586 kb，编码一条由 458 个氨基酸组成的多肽，在体内有多种异形体<sup>[26]</sup>。人类染色体 13q12.1 上还含一条与 ERRα cDNA 同源性高达 97% 的假基因，这也是在人基因库中首次发现孤儿受体的假基因<sup>[25]</sup>。

和多数核受体一样，ERR 分子结构由位于 N 端的 A/B 区域、DBD、铰链区 D 和 LBD 组成，N 端的 A/B 区域有一个不依赖于配体的 AF-1，由于不同的剪辑方式会使 ERRs 产生缺少 AF-1 的异构体。目前已经发现两种 ERRγ 的异构体，ERRγ1 和 ERRγ2，其中 ERRγ2 比 ERRγ1 在 N 端多 23 个氨基酸<sup>[27]</sup>。DBD 主要依靠其中的两个锌指结构与靶基因的 DNA 反应元件结合，而 LBD 是一个由 11-12 个 α 螺旋 (H1-H12) 形成的三明治式的结构，转录激活由 H12 的 AF-2 介导，和 H3、H4 和 H12 形成的疏水表面与共激活子家族的 LXXLL 基序之间的相互作用完成<sup>[28]</sup>。不论在 DBD 区域还是在 LBD 区域，三种 ERR 氨基酸序列的同源性都很高，因而它们可能结合相同的配体和调控相同的靶基因序列。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库